

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-147607

(43)Date of publication of application : 06.06.1990

(51)Int.Cl.

C08F 8/30
G01N 33/545
// C08F 20/56
G01N 30/48

(21)Application number : 63-300629

(71)Applicant : JAPAN SYNTHETIC RUBBER CO
LTD

(22)Date of filing : 30.11.1988

(72)Inventor : IMAI SENZOU
ONIZUKA ATSUKO
HIKATA MIKIO

(54) FUNCTIONAL PARTICLE AND PREPARATION THEREOF

(57)Abstract:

PURPOSE: To make it possible to obtain stably a good dispersed state in a dispersing medium and to make it useful as a immunodiagnostic reagent, etc., by binding an amino acid having a plurality of amino groups with a polymer particle contg. carboxyl groups through amide bonds.

CONSTITUTION: A functional particle is prepd. by binding a carboxylated polymer (e.g. a carboxyl-modified polystyrene with a particle diameter of 0.2-10 μ m is pref.) as a base particle with an amino acid having a plurality of amino groups, e.g. lysine, through amide bonds. The functional particles are prepd. by activating the carboxylated polymer particles with a water-soluble carbodiimide and reacting an amino acid therewith.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

第2629909号

(45)発行日 平成9年(1997)7月16日

(24)登録日 平成9年(1997)4月18日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 8 F 8/30	MHD		C 0 8 F 8/30	MHD
20/54			20/54	
C 0 8 J 7/12	C E Y		C 0 8 J 7/12	C E Y
// G 0 1 N 30/48			G 0 1 N 30/48	R
33/545			33/545	B

請求項の数 2 (全 5 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願昭63-300629	(73)特許権者	999999999 日本合成ゴム株式会社 東京都中央区築地2丁目11番24号
(22)出願日	昭和63年(1988)11月30日	(72)発明者	今井 仙造 東京都中央区築地2丁目11番24号 日本 合成ゴム株式会社内
(65)公開番号	特開平2-147607	(72)発明者	鬼塚 敦子 東京都中央区築地2丁目11番24号 日本 合成ゴム株式会社内
(43)公開日	平成2年(1990)6月6日	(72)発明者	日方 幹雄 東京都中央区築地2丁目11番24号 日本 合成ゴム株式会社内
		(74)代理人	弁理士 大井 正彦
		審査官	杉原 進

(54)【発明の名称】 官能性粒子およびその製造方法

1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】アクリル酸、メタクリル酸若しくは不飽和ジカルボン酸またはこれらのエステルを重合または共重合して得られるカルボキシル基を有する重合体よりなる粒径0.01~100 μ mの粒子に、複数のアミノ基を有するアミノ酸が、当該アミノ基の1つによって形成されるアミド結合によって化学的に結合されていることを特徴とする官能性粒子。

【請求項2】アクリル酸、メタクリル酸若しくは不飽和ジカルボン酸またはこれらのエステルを重合または共重合して得られるカルボキシル基を有する重合体よりなる粒径0.01~100 μ mの粒子に水溶性カルボジイミドを反応させて活性化し、この活性化された粒子に、複数のアミノ基を有するアミノ酸を作用させて当該アミノ基の1つを反応させ、これによって形成されるアミド結合によ

2

って、当該アミノ酸を前記粒子に化学的に結合させることを特徴とする官能性粒子の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】

本発明は官能性粒子およびその製造方法に関する。

【従来の技術】

一般に、アミノ基などの官能基を有する物質よりなる官能性粒子に対しては、当該官能基の化学的反応性を利用して、各種のリガンドを化学的に結合させることが可能である。そして現在においては、この手法を利用して、アフイニティークロマトグラフィー、固定化酵素、診断薬などの担体として広く利用されている。

例えばアミノ基を有する官能性粒子に対しては、ジメチルマロンイミデートなどのビスイミデート類；酒石酸アジドなどのアジド類；1,5-ジフルオロ-2,4-ジニト

10

ロベンゼンなどのアリールハライド類；ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒドなどのアルデヒド類；N,N'-フェニレンジマレイミドなどのジマレイミド類；2,2'-ジカルボキシ-4,4'-アゾフェニルジイソシアネートなどのジイソシアネート類；その他の結合試薬を作用させることにより、当該試薬の種類に応じたリガンドを当該粒子に化学的に結合させることができる。

そして、前記アミノ基を有する官能性粒子を製造する方法としては、ニトロ化ポリスチレンの粒子を還元処理する方法、グリンジル基を有する物質の粒子にアンモニアを反応させる方法、エポキシ基を有する物質の粒子にヒドラジンを反応させる方法、カルボキシル基を有する物質の粒子にジアミンまたはヒドラジンを反応させる方法が知られている。

〔発明が解決しようとする課題〕

しかしながら、従来の方法によって得られるアミノ基を有する官能性粒子は、リガンドが化学的に結合されることにより、粒子系全体の荷電量が大きく変化することとなり、その結果、分散媒中で安定な分散状態が得られず、当該粒子が凝集して沈殿が生ずるなど、分散状態が不良となる場合が多々発生する。そして、このように粒子の分散状態が不良となると、特に粒子の凝集を利用する免疫診断薬においては、信号に対するノイズの割合が増加するために測定感度が大幅に低下する結果となる。

以上のような理由から、アミノ基による官能性を有し、当該アミノ基にリガンドを結合させた状態においても、分散媒中における分散状態が良好でしかも安定している官能性粒子の提供が望まれている。

〔課題を解決するための手段〕

本発明は、アミノ基による官能性を有し、当該アミノ基にリガンドを結合させた状態においても、分散媒中において良好で安定な分散状態が得られる官能性粒子およびその製造方法を提供することを目的とする。

本発明の官能性粒子は、アクリル酸、メタクリル酸若しくは不飽和ジカルボン酸またはこれらのエステルを重合または共重合して得られるカルボキシル基を有する重合体よりなる粒径0.01~100 μ mの粒子に、複数のアミノ基を有するアミノ酸が、当該アミノ基の1つによって形成されるアミド結合によって化学的に結合されていることを特徴とする。

以下、本発明について具体的に説明する。

本発明においては、アクリル酸、メタクリル酸若しくは不飽和ジカルボン酸またはこれらのエステルを重合または共重合して得られる、カルボキシル基を有する重合体よりなる粒子であって、その粒径が0.01~100 μ mであるものが基体粒子として用いられる。その具体例とし

ては、アクリル酸またはメタクリル酸の重合体、スチレンとアクリル酸またはメタクリル酸との共重合体、スチレンとイタコン酸、フマル酸、マレイン酸などの不飽和ジカルボン酸との共重合体、アクリル酸またはメタクリル酸のエステルを重合または共重合させた後、これをアルカリで加水分解して得られる重合体よりなる粒子などを好適に使用することができる。

この基体粒子の粒径は0.1~20 μ mであることが好ましく、更に好ましくは0.2~10 μ mである。

この基体粒子にアミノ基を導入するために、複数のアミノ基を有するアミノ酸（以下「特定アミノ酸」という）が用いられる。この特定アミノ酸は、複数のアミノ基を有するものであればその種類が制限されるものではなく、例えばリジン、アルギニン、アスパラギン、グルタミン、ヒスチジン、トリプトファンおよびこれらの塩酸塩並びに水和物などを好適に用いることができる。

本発明の官能性粒子は、上記の基体粒子に水溶性カルボジイミドを反応させて活性化し、この活性化された粒子に、特定アミノ酸を作用させて当該アミノ基の1つを反応させ、これによって形成されるアミド結合によって、当該アミノ酸を前記粒子に化学的に結合させることによって製造される。

この反応に用いられる水溶性カルボジイミドとしては、例えば1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩、1-シクロヘキシル-3-(2-モノホリノエチル)カルボジイミドメソープラトルエンスルホネイトなどが挙げられる。

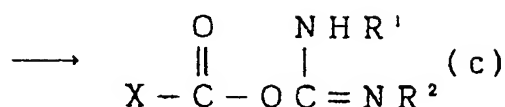
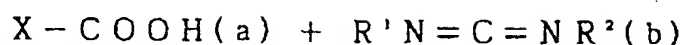
また、上記の基体粒子に対して特定アミノ酸を導入するためには、例えば次のイ)およびロ)の工程よりなる方法を好適に利用することができる。

イ) 下記反応式(I)で示すように、基体粒子(a)に水溶性カルボジイミド(b)を基体粒子(a)のカルボキシル基量の等モル以上、好ましくは10倍モル以上用いて室温で1~6時間程度反応させ、活性化して活性化された粒子(c)を得る工程。

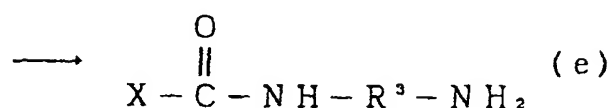
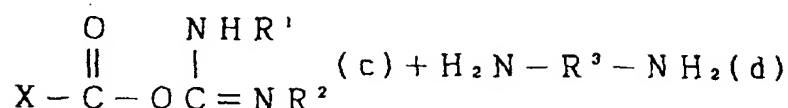
ロ) 下記反応式(II)で示すように、この活性化された粒子(c)に特定アミノ酸(d)を基体粒子(a)のカルボキシル基量の等モル以上、好ましくは10倍モル以上用いて室温で1~6時間程度反応させ、当該アミノ酸(d)の有する複数のアミノ基のうち1つによってアミド結合を形成させて官能性粒子(e)を得る工程。

なお、下記各式において、Xは基体粒子の重合体部分を表わし、R¹およびR²はいずれか一方がアンモニウム塩、他方は脂肪族基または脂環式基であり、R³はカルボキシル基を含有する基を示す。

5
反応式 (I)



反応式 (II)



以上のようにして基体粒子に結合されたアミノ酸残基は、アミド結合の形成に関与せずに残存する1個またはそれ以上のアミノ基と、カルボキシル基との両者を有するものである。従って、この粒子は当該アミノ基による官能性を有する官能性粒子であり、リガンドを化学的に結合させることが可能である。

すなわち、本発明の官能性粒子は、従来のアミノ基を有する官能性粒子と全く同様の用途に使用することができ、例えば抗原や抗体などの生物学的活性物質を結合させることによって診断薬を調製することができ、また、フルオレセインイソチオシアナート、ダンシルクロライド、ローダミンイソチオシアナート、フルオレスカミンなどのアミノ基と反応する官能基を有する蛍光色素を結合させることによって蛍光標識粒子を調製することができる。

さらに、本発明の官能性粒子は、結合されたアミノ酸残基にカルボキシル基が存在するため、当該カルボキシル基の作用により、上記のようにそのアミノ基にリガンドが化学的に結合された状態においても、分散媒において良好で安定した分散状態を保つことができ、凝集して沈澱を生ずるなどの分散状態が不良となることがない。

本発明の官能性粒子において、このように良好な分散性が得られる理由は、結合されたアミノ酸残基におけるカルボキシル基のために、リガンドを結合させたときの粒子系全体の荷電の変化が抑制され、当該粒子のイオンの分散安定性が阻害されないからであると考えられる。

〔実施例〕

以下、本発明の実施例について説明するが、これによって本発明が限定されるものではない。

実施例 1

<官能性粒子の調製>

平均粒径が0.727 μ m、カルボキシル基による表面荷電量が0.024ミリグラム当量COOH/gのカルボキシン変性ポリスチレンラテックス「イムテックスG0702」（日本合成ゴム（株）製）を基体粒子として用い、これを10重量%の割合で蒸留水に懸濁させて得られる懸濁液の10mlに対し、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩（同仁化学研究所製）を前記ラテックスの全カルボキシル基量の10倍モル含有する水溶液10mlを加え、振盪しながら室温で2時間反応させて活性化処理を行い、更に蒸留水で3回洗浄して活性化された粒子を得た。

一方、L-リジン塩酸塩を蒸留水を溶解して得られる濃度50ミリモル/lのアミノ酸溶液10mlを上記活性化された粒子に加え、振盪しながら室温で2時間反応させた。その後、得られた粒子を蒸留水で3回洗浄し、超音波による再分散と濾過を行ってL-リジンが結合される官能性粒子1を調製した。

<アミノ基の定性試験>

上記のようにして得られた官能性粒子1を1重量%含有する懸濁液0.1mlに、0.2Mのホウ酸緩衝液（pH10）0.1mlと、濃度2mg/mlのフルオレスカミンジオキサン溶液0.1mlとを加え、紫外線ランプよりの紫外線を照射したところ、粒子には蛍光が認められ、該官能性粒子にはアミノ基が存在していたことが確認された。

これに対し、上記官能性粒子 1 の調製に用いた基体粒子それ自体について、上記と同様の定性試験を行ったが、粒子に蛍光は認められず、該基体粒子にはフルオレスカミンジオイサンが結合しないことが確認された。＜電導度滴定によるカルボキシル基およびアミノ基の定量試験＞

上記官能性粒子 1 の 1g を蒸留水 80ml に懸濁し、この懸濁液に 0.1N の水酸化ナトリウム水溶液 4ml を加え、これに対してポテンショグラフ「E536 型」（メトラ社製）を用いて 0.1N の塩酸水溶液による滴定を行って官能性粒子 1 についての表面電荷量を測定したところ、0.021 ミリグラム当量のカルボキシル基が検出された。

また、上記懸濁液に 0.1N の塩酸水溶液 2ml を加え、これに対して 0.1N の水酸化ナトリウム水溶液による滴定を行ったところ、0.020 ミリグラム当量のアミノ基が検出された。

＜粒径分布の測定＞

上記官能性粒子 1 および基体粒子の各々について、光散乱式粒度分布計「LPA3100 型」（大塚電子社製）によって粒径分布を測定したところ、いずれも同じ粒径分布を有し、活性化処理および L-リジン結合処理による粒子の凝集状態に対する影響は認められなかった。

実施例 2

＜官能性粒子の調製＞

平均粒径が $1.096 \mu\text{m}$ 、カルボキシル基による表面荷電量が 0.087 ミリグラム当量 COOH/g のカルボキシ変性ポリスチレンラテックス「イムテックス L0101」（日本合成ゴム（株）製）を基体粒子として用いたほかは、実施例 1 と同様にして L-リジンが結合されてなる官能性粒子 2 を調製した。

＜蛍光標識粒子の調製＞

上記のようにして得られた官能性粒子 2 を 1 重量% の割合で含有する懸濁液 1 容量部に、0.05M の炭酸ソーダ緩衝液による濃度 0.5mg/ml のフルオレセインイソチオシアナート 1 容量部を加え、これを暗所に室温で 2 時間振盪した後、0.05M の炭酸ソーダ緩衝液で 3 回洗浄した。

得られた懸濁液について、蛍光顕微鏡「オリンパス BH S-RFK 型」（オリンパス光学社製）で観察したところ、粒子に強い蛍光が認められ、蛍光標識粒子が得られた。また、分散状態も良好であることが認められた。

これに対し、上記官能性粒子 2 の調製に用いた基体粒子それ自体について、上記と同様に蛍光標識粒子の調製を行ったが、粒子に蛍光は全く認められず、蛍光標識粒子は得られなかった。

実験例

＜スライド凝集試薬の調製＞

実施例 1 で調製した官能性粒子 1 を 1 重量% 含有する懸濁液 1 容量部にグルタルアルデヒドを 2.5 重量% とする割合で添加し、室温で 2 時間反応させた。この反応

液を 0.05M のリン酸緩衝液（pH8.5）2 時間透析した後、抗ヒト CRP 抗体（ヤギ抗体、カッペル社製）と 0.05M のリン酸緩衝液とを用いて濃度 $50 \mu\text{g/ml}$ に調製した溶液 1 容量部を加え、室温で 2 時間反応させ、得られた粒子を、0.1 重量% のウシ血清アルブミンを含む 0.01M のリン酸緩衝液（pH7）で洗浄し、この粒子を濃度が 1 重量% となるよう再懸濁して、抗ヒト CRP 抗体結合粒子を調製した。これを「試料 A」とする。

＜比較用スライド凝集試薬の調製＞

実施例 1 の基体粒子それ自体について実施例 1 と同様にして活性化処理を施し、得られた粒子を蒸留水（pH7）で濃度 1 重量% となるよう再懸濁し、この懸濁液の 1 容量部に、蒸留水（pH7）を用いて調製した濃度 $50 \mu\text{g/ml}$ の抗ヒト ORP 抗体水溶液の 1 容量部を加え、室温で 2 時間反応させ、得られた粒子を、0.1 重量% のウシ血清アルブミンを含む 0.01M のリン酸緩衝液（pH7）により洗浄し、この粒子を濃度が 1 重量% となるよう再懸濁して比較用の抗ヒト CRP 抗体結合粒子を調製した。これを「試料 B」とする。

＜スライド凝集テスト＞

濃度 $100 \mu\text{g/ml}$ のヒト CRP 陽性血清（栄研化学製）を用いて調製した、各々第 1 表に示す濃度の合計 5 種の溶液の各 $50 \mu\text{l}$ と、上記のようにして得られ試料 A または比較用の試料 B の各 $50 \mu\text{l}$ とを用いてスライド凝集テストを行い、凝集の程度を調べた。結果を第 1 表に示す。

第 1 表の結果から、本発明の官能性粒子による試料 A は、分散安定性が良好であり、このため、官能性粒子 1 はヒト CRP 陽性濃度が $0 \mu\text{g/ml}$ のときには全く凝集が認められず、 $0.1 \mu\text{g/ml}$ で凝集が判別でき、高感度の測定が達成されることが明らかである。

第 1 表

試料	凝集の程度				
	ヒト CRP 陽性血清濃度 ($\mu\text{g/ml}$)				
	0	0.1	0.2	0.5	1.0
試料 A	—	±	+	++	+++
試料 B	±	±	±	++	+++

〔発明の効果〕

以上のように、本発明によれば、リガンドが化学的に結合された状態であっても、分散媒中において凝集して沈殿が生じたり分散不良を生ずることがなくて良好な分散状態が安定して得られる、アミノ基による官能性を有する官能性粒子、並びにこの官能性粒子を有利に製造する方法を提供することができる。

本発明の官能性粒子によれば、例えば免疫診断薬の粒子の凝集を利用する免疫診断薬において、著しく高い感度を得ることができる。

フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁶

C 0 8 L 33:02

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所